



Dynamic Search: INPADOC/Family and Legal Status, Derwent World Patents Index®

Records for: PN=JP 05176797

save as alert...

save strategy only...

Output

Format: Long

Output as: Browser

display/send

Modify

refine search

back to picklist

select

all none

Records 1 of 1 In long Format

☐ 1. 5/34/1 (Item 1 from file: 351)

009567325

WPI Acc No: 1993-260873/ 199333

Determn. of cholesterol for clinical examination over wide pH range - using cholesterol dehydrogenase in the presence of hydrazine hydrate (deriv.) partic. by end-point method

Patent Assignee: KOKUSAI SHIYAKU KK (KOKU-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 5176797	A	19930720	JP 91359044	A	19911227	199333 B
JP 2994831	B2	19991227	JP 91359044	A	19911227	200006

Priority Applications (No Type Date): JP 91359044 A 19911227

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 5176797	A	10	C12Q-001/60		
JP 2994831	B2	9	C12Q-001/60		Previous Publ. patent JP 5176797

Abstract (Basic): JP 5176797 A

Determn. of cholesterol uses cholesterol dehydrogenase in the presence of hydrazine hydrate, its salts or deriv., partic. by end-point method. Cholesterol is reacted with cholesterol hydrogenase in the presence of 5-500, pref. 20-200 mM of hydrazine hydrate, its salts or derivs. which blocks deta4-cholestenone (e.g. hydrazine hydrate, hydrazinium sulphate, phenylhydrazinium chloride or sulphate, and hydrazine pyridine). The formed NADPH is determined by absorption at 340 nm..

USE/ADVANTAGE - Accurate, stable determination of cholesterol in clinical examination in a wide pH.

In an example, reagent A-1 = A compsn. composed of six U/ml of cholesterol esterase, 6.5 mM of beta-NAD+, three g/L of Triton X-100, 50 mM of hydrazine and 0.1M of Tris buffer (pH 10.0). Reagent A-2 = 10 U/ml of cholesterol dehydrogenase, three g/L of Triton X-100 and 0.1M of Tris buffer (pH 10.0). In 10 micro L of reagent A-1, 10 micro L of diluted serum sample was added warmed to 37 deg. C for five min. and the absorption at 340 and 700 nm was determined. Then 100 micro L of reagent A-2 was added and similar procedure was repeated. Purified water was used as a blank standar

Dwg. 0/0

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/60

International Patent Class (Additional): C12Q-001/32

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-176797

(43)公開日 平成5年(1993)7月20日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/60		6807-4B		
1/32		6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数4(全 10 頁)

(21)出願番号 特願平3-359044

(22)出願日 平成3年(1991)12月27日

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72)発明者 岸 浩司

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際  
試薬株式会社研究開発センター内

(72)発明者 白波瀬 泰史

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際  
試薬株式会社研究開発センター内

(72)発明者 渡津 吉史

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際  
試薬株式会社研究開発センター内

(74)代理人 弁理士 高島 一

(54)【発明の名称】 コレステロールの定量法および定量用試薬

(57)【要約】

【目的】 広範囲のpH領域にて適応可能で、酵素の可逆的反応の起こりにくいコレステロールの定量法(特に、終点測定法による方法)および当該方法に使用される試薬を提供すること。

【構成】 コレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを定量する方法であって、コレステロール脱水素酵素による反応を抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体の存在下に行うコレステロールの定量法、および抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体を含有する上記方法に使用される試薬。

【効果】 広範囲のpH領域において適応可能で、酵素の可逆的反応の起こりにくいコレステロール定量法であり、終点測定法に特に有利に使用可能である。また、自動分析機にも有利に使用可能である。さらに、広範囲のpH域が設定できるため他の共役酵素反応系と組み合わせることも容易で実用上の応用性も高い。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを定量する方法であって、コレステロール脱水素酵素による反応を抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体の存在下に行うことを特徴とするコレステロールの定量法。

【請求項2】 終点測定法による請求項1記載のコレステロールの定量法。

【請求項3】 抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体を含有することを特徴とするコレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを測定する際に使用されるコレステロールの定量用試薬。

【請求項4】 終点測定法に使用される請求項3記載のコレステロールの定量用試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、主として臨床検査の分野での使用を目的とするコレステロールの定量法および当該定量法を行う際に使用される定量用試薬に関する。

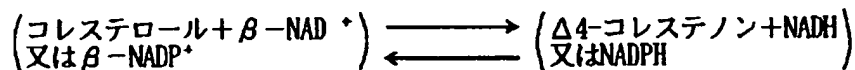
## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】従来、酵素を用いたコレステロールの定量法として遊離型または結合型コレステロールを測定するにあたり、コレステロールオキシダーゼを単独またはコレステロールエステラーゼとともに用いる方法がよく知られている。しかし、コレステロールオキシダーゼを用いて生成した過酸化水素をパーオキシダーゼ等により発色系に導く方法は操作が煩雑である上に、ビリルビン、アスコルビン酸等の還元性物質の影響を受けて測定誤差を生じ易く、更に呈色の安定性が良くない等の問題点がある。

【0003】臨床検査の分野では、いわゆる終点測定法（エンドポイント法ともいう、または、初速度測定法（レイトアッセイ法ともいう）と称する動力学的測定法のいずれかが用いられている。コレステロールオキシダーゼを用いる方法には、このような動力学的測定法も知られている（特公昭58-18080号公報）が、この方法でも前述のような還元性物質の影響を受けるといって問題点は依然として未解決のままであった。

【0004】一方、コレステロールオキシダーゼではなく、コレステロール脱水素酵素を用いるコレステロールの定量法も報告されており、たとえばニコチンアデニンジヌクレオチド（NAD）依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ（NAD-CDH）またはニコチンアデニン\*

NAD-CDH又は  
NADP-CDH



\*ジヌクレオチドリリン酸（NADP）依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ（NADP-CDH）（特公平2-18064号公報）を用いるコレステロールの定量法の報告がある（特公平2-49720号公報）。この方法は、操作が簡単で血中のビリルビン、アスコルビン酸等の影響を受けない優れた方法であるが、反応にはpH 8.6以上のアルカリ条件が要求されている。また、この酵素を動力学的測定法に応用した報告もある（特開昭61-108400号公報）。しかし、この方法は終点測定法でないため、測定時に必ず標準液で検定しなければならず、再現性も良くないという問題点がある。

【0005】終点測定法は、コレステロールの定量法としては再現性に優れるため、従来動力学的測定法として用いられたコレステロール脱水素酵素による方法は、終点測定法に改良することが望まれる。しかしながら、ここで用いるコレステロール脱水素酵素の至適pHは9.0付近であるが、この付近のpHでは反応成分である $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup>が不安定となり徐々に着色するため、コレステロールの定量用試薬としてこのままでは使用できない。また、 $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup>を安定化するためにpHを低下させると当該酵素の可逆的反応に起因して高濃度のコレステロールは反応が進行せず、そのため臨床検査でのコレステロールの定量に支障をきたす。

【0006】本発明の目的は、広範囲のpH領域において適応可能で、酵素の可逆的反応の起こりにくいコレステロールの定量法およびこの定量法を実施するにあたって使用される定量用試薬を提供することにある。特に、本発明の目的は、終点測定法が有利に使用可能なコレステロールの定量法およびこの定量法を実施するにあたって使用される定量用試薬を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段および作用】本発明者らは、上述の目的を達成するために鋭意研究を重ねてきたところ、下記の反応で示されるコレステロール脱水素酵素の反応系（以下、反応式Aという）に抱水ヒドラジン、その塩、またはその誘導体を存在させることにより、コレステロール脱水素酵素の至適pH付近のアルカリ側から中性付近の広いpH範囲においてコレステロールの定量が可能になることを見出し、さらに研究を重ねて本発明に至った。

## 【0008】

## 【化1】

【0009】本発明のコレステロールの定量用試薬は、コレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを測定する際に使用されるコレステロールの定量用試薬であって、抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体を含有

3

することを特徴とする。本発明のコレステロールの定量法は、コレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを定量する方法であって、コレステロール脱水素酵素による反応を抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体の存在下に行うことを特徴とする。

【0010】本発明で使用されるコレステロール脱水素酵素としては、NAD-CDHとNADP-CPHがあり、コレステロール脱水素酵素による反応系は前記反応式Aで示した通りである。

【0011】コレステロール脱水素酵素は可逆的の反応を呈し、反応がコレステノンの生成に進行してある程度進むと平衡に達する。そのため、従来はコレステロール脱水素酵素の至適pHであるpH9.0付近にして更に反応の進行を促している。このような至適pHにおいては、当該酵素量を最小量にできると共に、試薬とした場合、原料に混入する他の酵素が起因するブランク値の上昇を押さえることもできる。

【0012】本発明は、抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体の存在下にコレステロール脱水素酵素を反応させることにより、上記反応で生成された $\Delta^4$ -コレステノンのケトン基をブロックすることができるという新知見に基づくものである。この結果コレステロールの測定での逆反応を押さえることができ、広いpH範囲でコレステロールの定量を可能とするものである。具体的には、本発明では反応液のpHは、pH10.0を超えるアルカリ領域からpH7.0以下の中性領域まで適応できる。

【0013】本発明に用いる抱水ヒドラジン、その塩およびその誘導体としては、 $\Delta^4$ -コレステノンのケトン基をブロックすることができるものであれば、特に限定はない。抱水ヒドラジン誘導体としては、ヒドラジンを基本骨格基とする化合物が該当できる。これらの具体例としては、ヒドラジン（1水和物）、二塩化ヒドラジニウム、一臭化ヒドラジニウム、硫酸ヒドラジニウムが好適であり、そのほか塩化フェニルヒドラジニウム、フェニルヒドラジン-P-スルホン酸、硫酸フェニルヒドラジニウム、ヒドラジンピリジン等を挙げることできる。

【0014】本発明のコレステロールの定量法によれば、コレステロール脱水素酵素による反応を抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体の存在下に行うことにな\*

4

\*る。ここで添加する抱水ヒドラジン、その塩、その誘導体の量は、その種類、その組成、その他の条件によって異なるが、通常は反応系における組成物全量に対して5~500mM、好ましくは20~200mMである。

【0015】本発明の方法によるコレステロールの定量法は臨床検査の分野では、遊離型または結合型コレステロールのいずれの測定にも利用できる。即ち、遊離型コレステロールの測定では単独で、結合型コレステロールの測定では公知のコレステロールエステラーゼの反応系を組合わせることにより測定が行われる。

【0016】本発明の方法は動力学的方法および終点測定法の両者に応用できるが、特に終点測定法として臨床検査の分野で有用に用いることができる。通常、終点測定法では、反応が短時間に終結することが必要である。即ち、反応が長時間に渡って続くような場合は、検体によって反応時間が異なり自動分析装置のように短時間の測定による方法では再現性も悪く、臨床検査では適用できない。ところが、本発明によれば反応は2分~3分で終了するため臨床検査に極めて好適である。

【0017】本発明において、コレステロールの定量法は、緩衝液、NAD(P)およびNAD(P)-CDHを検体（血清、コレステロール等）と混合して、一定時間反応させ、生成するNAD(P)Hの増加を測定することによって行われる。本発明のコレステロールの定量法における基本原理はNAD(P)Hの生成反応である。ここでは主波長が340nmでのNAD(P)Hの吸光度の上昇を測定するため、吸光度の減少反応と比較すると検量線の上限が高くとれるため、コレステロールの測定範囲を広くとることができる。更にコレステロールオキシダーゼ法のような還元性物質の影響を受けることもない。

【0018】

【実施例】以下、本発明を実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。実施例において使用した試薬は、以下に示したpH10.0、pH8.0、pH7.3のものである。また、これら試薬においては、抱水ヒドラジン等を添加したものと添加していないものを同時に作った。また、それぞれの反応性を考慮して酵素、補酵素およびヒドラジンの量を定めた。

【0019】

試薬A-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	6.5mM
	トリトンX-100	3g/l
	ヒドラジン	50mM
	トリス緩衝液(pH10.0)	0.1M
試薬A-2	コレステロール脱水素酵素	10単位/ml
	トリトンX-100	3g/l
	トリス緩衝液(pH10.0)	0.1M

【0020】

5				6
試薬a-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml		
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	8.4mM		
	トリトンX-100	3g/l		
	トリス緩衝液 (pH10.0)	0.1M		
試薬a-2	コレステロール脱水素酵素	25単位/ml		
	トリトンX-100	3g/l		
	トリス緩衝液 (pH10.0)	0.1M		

## 【0021】

試薬B-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml		
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	6.5mM		
	トリトンX-100	3g/l		
	ヒドラジン	150mM		
	トリス緩衝液 (pH8.0)	0.1M		
試薬B-2	コレステロール脱水素酵素	15単位/ml		
	トリトンX-100	3g/l		
	トリス緩衝液 (pH8.0)	0.1M		

## 【0022】

試薬b-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml		
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	8.4mM		
	トリトンX-100	3g/l		
	トリス緩衝液 (pH8.0)	0.1M		
試薬b-2	コレステロール脱水素酵素	30単位/ml		
	トリトンX-100	3g/l		
	トリス緩衝液 (pH8.0)	0.1M		

## 【0023】

試薬C-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml		
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	6.5mM		
	トリトンX-100	3g/l		
	ヒドラジン	200mM		
	リン酸緩衝液 (pH7.3)	0.1M		
試薬C-2	コレステロール脱水素酵素	20単位/ml		
	トリトンX-100	3g/l		
	リン酸緩衝液 (pH7.3)	0.1M		

## 【0024】

試薬c-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml		
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	8.4mM		
	トリトンX-100	3g/l		
	リン酸緩衝液 (pH7.3)	0.1M		
試薬c-2	コレステロール脱水素酵素	30単位/ml		
	トリトンX-100	3g/l		
	リン酸緩衝液 (pH7.3)	0.1M		

## 【0025】実施例1

本発明の方法の反応性を調べた。試薬a-1、a-2および試薬B-1、B-2を用いて、あらかじめ分子吸光係数の管理された日立7150自動分析機を使い、タイムコースを確認した。その結果は図1に示した通りである。しかし、試薬a-1、a-2および試薬B-1、B-2とも反応は2〜3分で終了しているが、試薬a-1、a-2は完全にコレステロールを消費しないうちに反応が停止し、試薬B-1、B-2ではコレステロール\*50

\*脱水素酵素の反応が平衡に達することもなくコレステロールを消費していることがわかる。

## 【0026】実施例2

これらの試薬を用いて、日立7150形自動分析装置により以下の操作を行った。まず、検体として血清の希釈系列それぞれ10 $\mu$ lに第1試薬250 $\mu$ lを加えて37℃で5分間加温し、主波長340nm、副波長700nmで吸光度を測定した。次に、第2試薬100 $\mu$ lを加えて37℃で5分間加温し、同じ波長で吸光度変化量

を測定した。同様に検体の代わりに精製水を用いて試薬ブランクを測定した。更に4種類の検体について既知の標準液の測定値をもとにして求める方法と、直接NADHの分子吸光係数 ( $\epsilon=6.3 \text{ cm}^2/\text{mole}$ ) から求める方法で測定した。そして対照として市販のコレステロール\*

\*ル測定用試薬(国際試薬(株)製品でコレステロールオキシダーゼを用いる方法)による測定値も求めた。これらの結果は図2～図4および表1に示す。

【0027】

【表1】

検体のコレステロール測定結果 (単位はmg/dl)

(1)標準液を用いる方法

試薬 検体No	A-1 A-2	a-1 a-2	B-1 B-2	b-1 b-2	C-1 C-2	c-1 c-2	市販品 (対照)
1	181	185	183	204	186	—	182
2	141	147	143	157	144	—	147
3	234	248	236	242	233	—	234
4	182	184	185	196	181	—	182

(2)NADHの分子吸光係数による方法

試薬 検体No	A-1 A-2	a-1 a-2	B-1 B-2	b-1 b-2	C-1 C-2	c-1 c-2
1	175	162	179	121	180	—
2	137	129	140	101	147	—
3	232	227	233	150	240	—
4	180	159	181	123	181	—

【0028】以上の結果、本発明の方法はヒドラジンを添加しない従来の方法に比べ検体の希釈系列からみて直線性が優れていることが判る。また検体の測定値からみると、本発明の方法は標準液の測定値から求めた値と、NADHの分子吸光係数から求めた値は一致し、しかも市販の試薬ともよく一致した値が得られた。これに対して、ヒドラジンを添加しない従来の方法はNADHの分子吸光係数から求めた値が全般に低値を示し、終点測定法での測定に問題があることが判る。更に本発明の方法では、各pH間で直線性や測定値に有意な差がないことも判る。

【0029】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の方法は広範囲のpH領域において適応可能で、従って酵素の可逆※

※的反応の起こりにくいコレステロール定量法であり、終点測定法としてもコレステロールの定量が可能であり、自動分析機が普及している臨床検査の分野で、有用な方法として供することができる。また広範囲のpH域が設定できるため他の共役酵素反応系と組み合わせることも容易で実用上の応用性も高いという効果を有する。

【図面の簡単な説明】

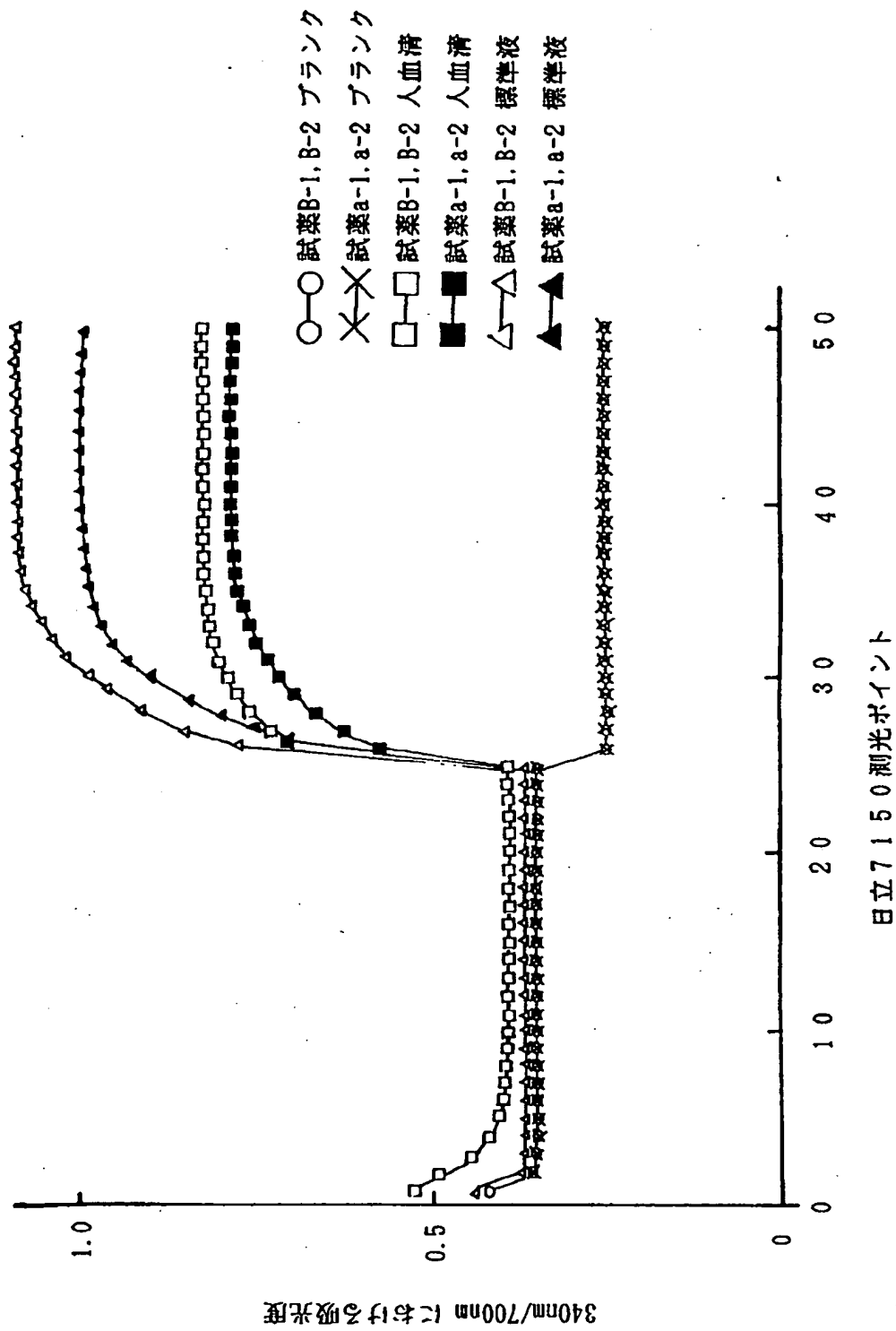
【図1】本発明の方法の反応性を示したグラフである。

【図2】本発明の方法と従来の方法(pH10.0のとき)の対比を示したグラフである。

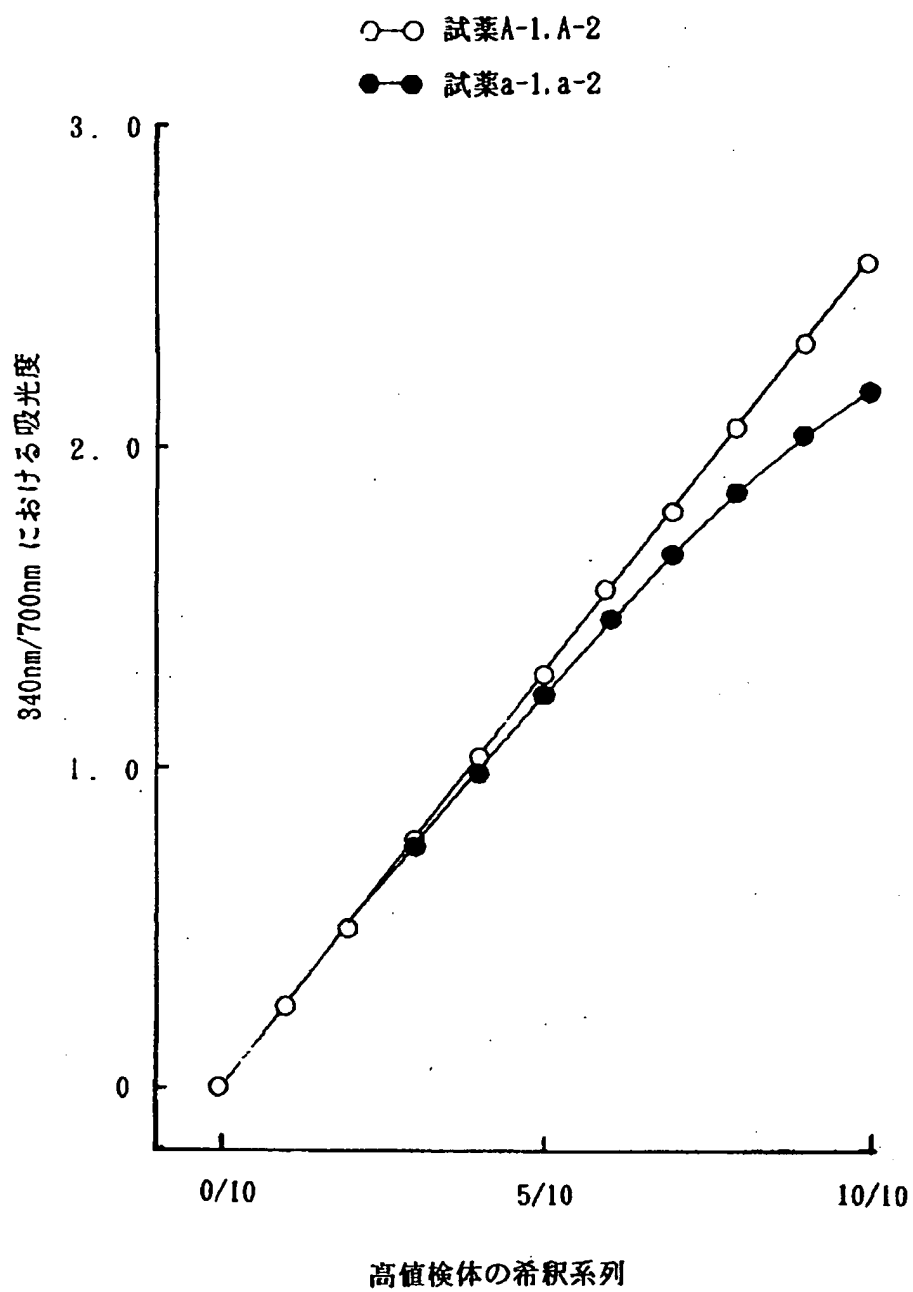
【図3】本発明の方法と従来の方法(pH8.0のとき)の対比を示したグラフである。

【図4】本発明の方法と従来の方法(pH7.3のとき)の対比を示したグラフである。

【図1】

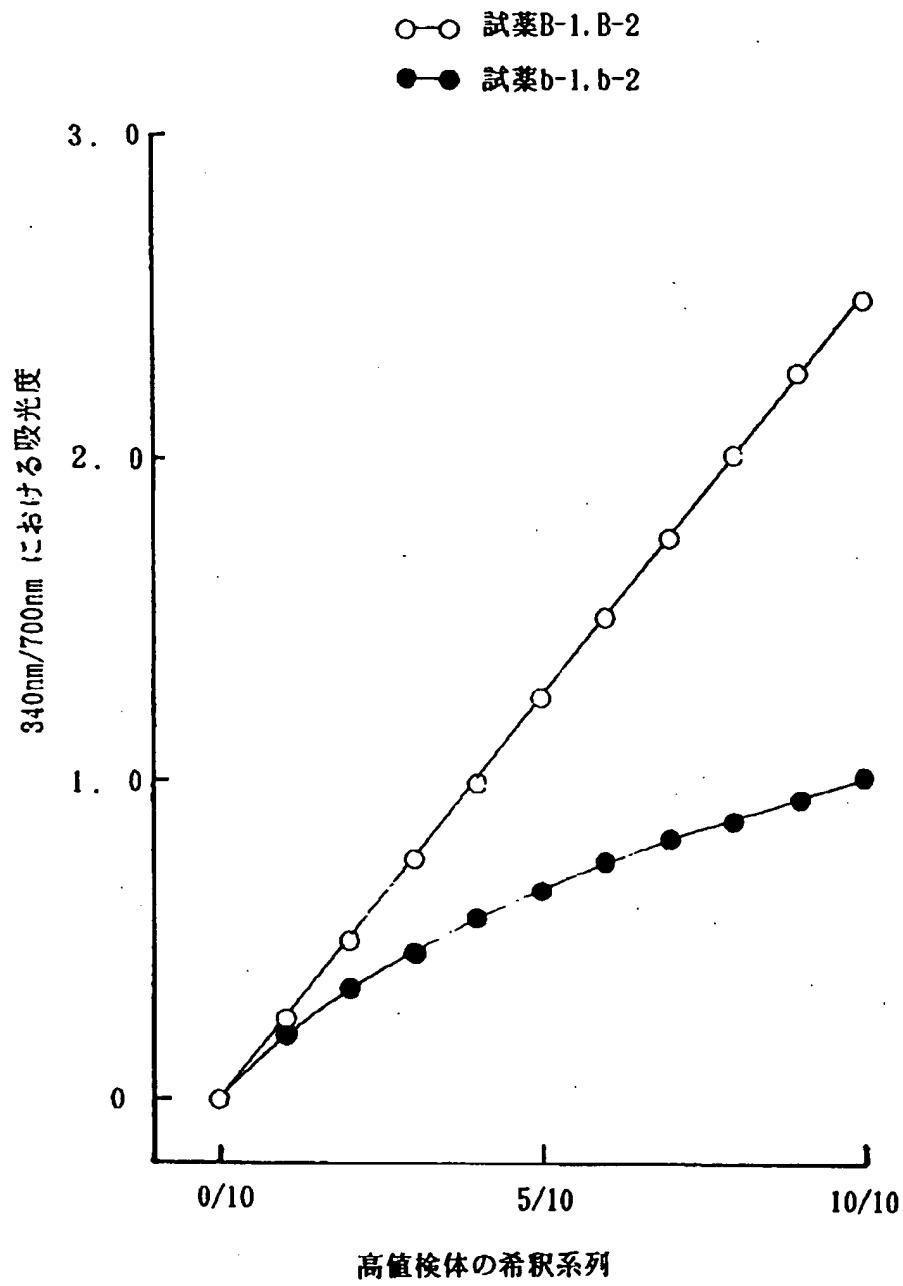


【図2】

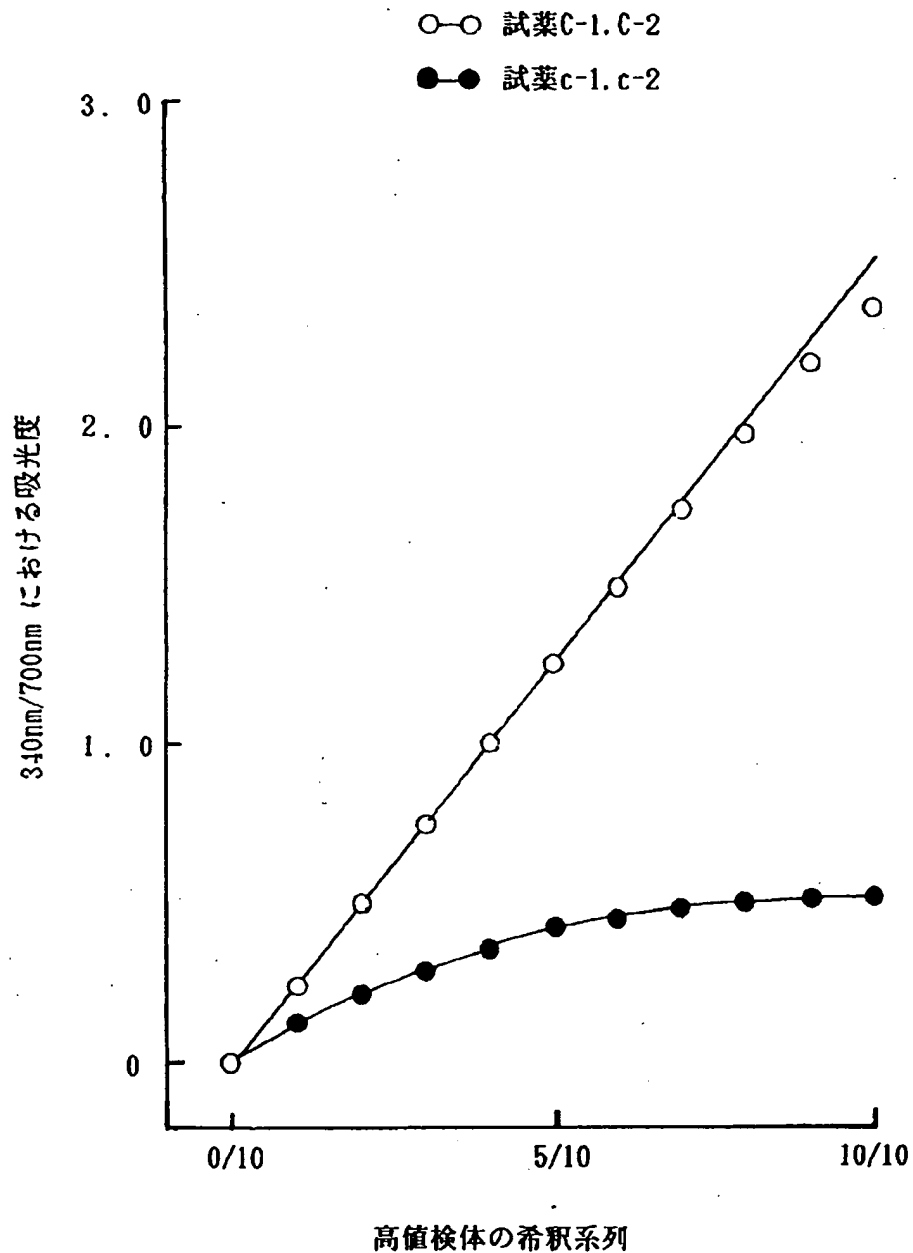




【図3】



【図4】



## 【手続補正書】

【提出日】平成4年2月26日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0003】臨床検査の分野では、いわゆる終点測定方法（エンドポイント法ともいう）または、初速度測定法（レイトアッセイ法ともいう）と称する動力学的測定法のいずれかが用いられている。コレステロールオキシダ

一ゼを用いる方法には、このような動力学的測定法も知られている（特公昭58-18080号公報）が、この方法でも前述のような還元性物質の影響を受けるという問題点は依然として未解決のままであった。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】本発明で使用されるコレステロール脱水素酵素としては、NAD-CDHとNADP-CDHがあり、コレステロール脱水素酵素による反応系は前記反応式Aで示した通りである。

JP5-176797-A

**THOMSON****MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):****(19)【発行国】**

日本国特許庁 (JP)

**(19)[ISSUING COUNTRY]**

Japan Patent Office (JP)

**(12)【公報種別】**

公開特許公報 (A)

**(12)[GAZETTE CATEGORY]**

Laid-open Kokai Patent (A)

**(11)【公開番号】**

特開平 5-176797

**(11)[KOKAI NUMBER]**Unexamined Japanese Patent Heisei  
5-176797**(43)【公開日】**

平成5年(1993)7月20日

**(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]**

July 20, Heisei 5 (1993. 7.20)

**(54)【発明の名称】**コレステロールの定量法および定量  
用試薬**(54)[TITLE OF THE INVENTION]**Assay method and reagent for assay of  
cholesterol**(51)【国際特許分類第5版】**

C12Q

6807-4B

1/32

6807-4B

**(51)[IPC INT. CL. 5]**

1/60 C12Q 1/60

6807-4B

1/32

6807-4B

**【審査請求】** 未請求**[REQUEST FOR EXAMINATION]** No**【請求項の数】** 4**[NUMBER OF CLAIMS]** 4**【全頁数】** 10**[NUMBER OF PAGES]** 10**(21)【出願番号】**

特願平 3-359044

**(21)[APPLICATION NUMBER]**

Japanese Patent Application Heisei 3-359044

**(22)【出願日】**

平成3年(1991)12月27日

**(22)[DATE OF FILING]**

December 27, Heisei 3 (1991. 12.27)

(71)【出願人】

【識別番号】

000170565

【氏名又は名称】

国際試薬株式会社

【住所又は居所】

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目  
1番30号

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

[ID CODE]

000170565

[NAME OR APPELLATION]

International Reagents KK

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72)【発明者】

【氏名】

岸 浩司

【住所又は居所】

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2  
国際試薬株式会社研究開発センタ  
ー内

(72)[INVENTOR]

[NAME OR APPELLATION]

Kishi, Koji

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72)【発明者】

【氏名】

白波瀬 泰史

【住所又は居所】

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2  
国際試薬株式会社研究開発センタ  
ー内

(72)[INVENTOR]

[NAME OR APPELLATION]

Shirahase, Yasushi

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72)【発明者】

【氏名】

渡津 吉史

【住所又は居所】

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2  
国際試薬株式会社研究開発センタ  
ー内

(72)[INVENTOR]

[NAME OR APPELLATION]

Totsu, Yoshifumi

[ADDRESS OR DOMICILE]

**(74)【代理人】****【弁理士】****【氏名又は名称】**

高島 一

**(74)[AGENT]****[PATENT ATTORNEY]****[NAME OR APPELLATION]**

Takashima, Hajime

**(57)【要約】****【目的】**

広範囲のpH領域にて適応可能で、酵素の可逆的反応の起こりにくいコレステロールの定量法(特に、終点測定法による方法)および当該方法に使用される試薬を提供すること。

**【構成】**

コレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを定量する方法であって、コレステロール脱水素酵素による反応を抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体の存在下に行うコレステロールの定量法、および抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体を含む上記方法に使用される試薬。

**【効果】**

広範囲のpH領域において適応可能で、酵素の可逆的反応の起こりにくいコレステロール定量法であり、終点測定法に特に有利に使用可能である。また、自動分析機にも有利に使用可能である。さらに、広範囲のpH域が設定できるため他の共役

**(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]****[PURPOSE]**

The assay method (in particular the method of an end-point measurement method) of cholesterol which can be adapted in wide range pH region, where reversible reaction of an enzyme does not occur easily, and the reagent used by said method are provided.

**[CONSTITUTION]**

It is the method of assaying cholesterol using cholesterol dehydrogenase, comprised such that the reagent used by said method containing the assay method and the hydrazine hydrate, its salt, or its derivative(s) of the cholesterol which performs reaction by cholesterol dehydrogenase in the presence of a hydrazine hydrate, its salt, or its derivative(s).

**[ADVANTAGE]**

It is the cholesterol assay method which can be adapted in wide range pH region, where reversible reaction of an enzyme does not occur easily. It can favorably use in particular in an end-point measurement method. Moreover, it can favorably use in also an autoanalyzer. Furthermore, since wide range

酵素反応系と組み合わせることも容易で実用上の応用性も高い。

pH region can be set, it is also easy to combine with an another conjugation enzyme reaction system, so practical applicability is also high.

**【特許請求の範囲】****[CLAIMS]****【請求項1】**

コレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを定量する方法であって、コレステロール脱水素酵素による反応を抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体の存在下に行うことを特徴とするコレステロールの定量法。

**[CLAIM 1]**

A assay method of the cholesterol, which is the method of assaying cholesterol using cholesterol dehydrogenase, comprised such that reaction by cholesterol dehydrogenase is performed in the presence of a hydrazine hydrate, its salt, or its derivative(s).

**【請求項2】**

終点測定法による請求項1記載のコレステロールの定量法。

**[CLAIM 2]**

The assay method of cholesterol of Claim 1 by an end-point measurement method.

**【請求項3】**

抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体を含むことを特徴とするコレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを測定する際に使用されるコレステロールの定量用試薬。

**[CLAIM 3]**

Reagent for assay of the cholesterol used when measuring cholesterol using the cholesterol dehydrogenase, in which a hydrazine hydrate, its salt, or its derivative(s) is contained.

**【請求項4】**

終点測定法に使用される請求項3記載のコレステロールの定量用試薬。

**[CLAIM 4]**

The reagent for assay of cholesterol of Claim 3 used by the end-point measurement method.

**【発明の詳細な説明】****[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]****【0001】****[0001]****【産業上の利用分野】****[INDUSTRIAL APPLICATION]**

本発明は、主として臨床検査の分野での使用を目的とするコレステロールの定量法および当該定量法を行う際に使用される定量用試薬に関する。

This invention is related to the reagent for assay used when mainly performing the assay method and said assay method of cholesterol aiming at use in the field of a clinical laboratory test.

**【0002】****[0002]****【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】****[PRIOR ART AND PROBLEM TO BE SOLVED]**

従来、酵素を用いたコレステロールの定量法として遊離型または結合型コレステロールを測定するにあたり、コレステロールオキシダーゼを単独またはコレステロールエステラーゼとともに用いる方法がよく知られている。しかし、コレステロールオキシダーゼを用いて生成した過酸化水素をパーオキシダーゼ等により発色系に導く方法は操作が煩雑である上に、ビリルビン、アスコルビン酸等の還元性物質の影響を受けて測定誤差を生じ易く、更に呈色の安定性が良くない等の問題点がある。

Conventionally, for measuring a free type or bonding type cholesterol as an assay method of cholesterol using an enzyme, it is as follows. The method of using a cholesterol oxidase individually or together with a cholesterol esterase is learned well. However, in the method of inducing the hydrogen peroxide generated using the cholesterol oxidase to a color-development system by a peroxidase etc., in addition to operation being complicated, the influence of reducing substances, such as bilirubin and an ascorbic acid, is received, and it is easy to produce a measurement error,

**【0003】****[0003]**

臨床検査の分野では、いわゆる終点測定方法(エンドポイント法ともい

In the field of the clinical laboratory test, the any one of the dynamical measuring method



う、または、初速度測定法(レイトアッセイ法ともいう)と称する動力学的測定法のいずれかが用いられている。コレステロールオキシダーゼを用いる方法には、このような動力学的測定法も知られている(特公昭58-18080号公報)が、この方法でも前述のような還元性物質の影響を受けるという問題点は依然として未解決のままであった。

**[0004]**

一方、コレステロールオキシダーゼではなく、コレステロール脱水素酵素を用いるコレステロールの定量法も報告されており、たとえばニコチンアデニンジヌクレオチド(NAD)依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ(NAD-CDH)またはニコチンアデニンジヌクレオチドリリン酸(NADP)依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ(NADP-CDH)(特公平2-18064号公報)を用いるコレステロールの定量法の報告がある(特公平2-49720号公報)。この方法は、操作が簡単で血中のビリルビン、アスコルビン酸等の影響を受けない優れた方法であるが、反応にはpH8.6以上のアルカリ条件が要求されている。また、この酵素を動力学的測定法に応用した報告もある(特開昭61-108400号公報)。しかし、この方法は終点測定法でないため、測定時に必ず標準液で検定しなければならない、再現性も良くない

called what is called the end-point measurement method (it is also mentioned the endpoint method or an initial rate measuring method rate assay) is used. Although such a dynamical measuring method was also known by the method of using a cholesterol oxidase (Japanese Patent Publication No. 58-18080), the problem of receiving the influence of the above reducing substances also by this method was still unsolved.

**[0004]**

On the other hand, the assay method of cholesterol using cholesterol dehydrogenase instead of a cholesterol oxidase is also reported, for example, there exists a report of the assay method of cholesterol using a nicotine adenine dinucleotide (NAD) dependence cholesterol dehydrogenase (NAD-CDH) or a nicotine adenine dinucleotide-phosphoric acid (NADP) dependence cholesterol dehydrogenase (NADP-CDH) (Japanese Patent Publication No. 2-18064) (Japanese Patent Publication No. 2-49720). Operation is simple and this method is an outstanding method which does not receive the influence of bilirubin in blood, an ascorbic acid, etc. However, the alkali conditions more than pH 8.6 are required for reaction. Moreover, there also exists a report which applied this enzyme for the dynamical measuring method (Unexamined Japanese Patent No. 61-108400). However, since this method is not an end-point measurement method, you have to test it with a standard

という問題点がある。

solution to measuring time, there exists a problem that reproducibility is not good, either.

**【0005】**

終点測定法は、コレステロールの定量法としては再現性に優れるため、従来動力的測定法として用いられたコレステロール脱水素酵素による方法は、終点測定法に改良することが望まれる。しかしながら、ここで用いるコレステロール脱水素酵素の至適pHは9.0付近であるが、この付近のpHでは反応成分である $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup>が不安定となり徐々に着色するため、コレステロールの定量用試薬としてこのままでは使用できない。また、 $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup>を安定化するためにpHを低下させると当該酵素の可逆的反応に起因して高濃度のコレステロールは反応が進行せず、そのため臨床検査でのコレステロールの定量に支障をきたす。

**[0005]**

Since an end-point measurement method is excellent in reproducibility as an assay method of cholesterol, to improve the method of depending on the cholesterol dehydrogenase used as a conventional dynamical measuring method by an end-point measurement method is desired. However, the optimum pHs of the cholesterol dehydrogenase used here are 9.0 vicinity. However, since  $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup> which is the reaction component becomes unstable and colors gradually by pH of this vicinity, the way things stand, it cannot be used as a reagent for assay of cholesterol. Moreover, in order to stabilize  $\beta$ -NAD(P)<sup>+</sup>, when pH is made to reduce, it cause the reversible reaction of said enzyme, reaction of high concentration cholesterol does not advance, therefore, it interferes with assay of cholesterol in a clinical laboratory test.

**【0006】**

本発明の目的は、広範囲のpH領域において適応可能で、酵素の可逆的反応の起こりにくいコレステロールの定量法およびこの定量法を実施するにあたって使用される定量用試薬を提供することにある。特に、本発明の目的は、終点測定法が有利に使用可能なコレステロールの定量法およびこの定量法を実施するにあ

**[0006]**

The objective of the invention is providing the reagent for assay which is used in implementing the assay method of cholesterol which can be adapted in wide range pH region, where a reversible reaction of an enzyme does not occur easily, and this assay method. In particular the objective of the invention is providing the reagent for assay which is used in implementing the

たって使用される定量用試薬を提供することにある。

assay method of the cholesterol which an end-point measurement method can use advantageously, and this assay method.

【0007】

[0007]

【課題を解決するための手段および作用】

本発明者らは、上述の目的を達成するために鋭意研究を重ねてきたところ、下記の反応で示されるコレステロール脱水素酵素の反応系（以下、反応式Aという）に抱水ヒドラジン、その塩、またはその誘導体を存在させることにより、コレステロール脱水素酵素の至適pH付近のアルカリ側から中性付近の広いpH範囲においてコレステロールの定量が可能になることを見い出し、さらに研究を重ねて本発明に至った。

[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM AND OPERATION]

In order for the present inventors to achieve the above-mentioned objective, when earnest research was accumulated, it was discovered that assay of cholesterol is attained in the wide pH range of neutral vicinity from the alkali side of optimum-pH vicinity of cholesterol dehydrogenase by making a hydrazine hydrate, its salt, or its derivative(s) exist in the reaction system (henceforth reaction Formula A) of the cholesterol dehydrogenase shown by following reaction. When research was further accumulated, it resulted in this invention.

【0008】

[0008]

【化1】

[FORMULA 1]



NAD-CDH or NADP-CDH	
Cholesterol + $\beta$ -NAD <sup>+</sup>	$\Delta$ 4-cholestenone + NADH
Or $\beta$ -NADP <sup>+</sup>	Or NADPH

【0009】

[0009]

本発明のコレステロールの定量用試薬は、コレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを測定する

The reagent for assay of cholesterol of this invention is a reagent for assay of the cholesterol used when measuring cholesterol

際に使用されるコレステロールの定量用試薬であって、抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体を含有することを特徴とする。本発明のコレステロールの定量法は、コレステロール脱水素酵素を用いてコレステロールを定量する方法であって、コレステロール脱水素酵素による反応を抱水ヒドラジン、その塩またはその誘導体の存在に行うことを特徴とする。

**[0010]**

本発明で使用されるコレステロール脱水素酵素としては、NAD-CDHとNADP-CPHがあり、コレステロール脱水素酵素による反応系は前記反応式Aで示した通りである。

**[0011]**

コレステロール脱水素酵素は可逆的反応を呈し、反応がコレステノンの生成に進行してある程度進むと平衡に達する。そのため、従来はコレステロール脱水素酵素の至適pHであるpH9.0付近にして更に反応の進行を促している。このような至適pHにおいては、当該酵素量を最小量にできると共に、試薬とした場合、原料に混入する他の酵素が起因するブランク値の上昇を押さえることもできる。

**[0012]**

本発明は、抱水ヒドラジン、その塩ま

using cholesterol dehydrogenase, comprised such that it is characterized by containing a hydrazine hydrate, its salt, or its derivative(s). The assay method of cholesterol of this invention is the method of assaying cholesterol using cholesterol dehydrogenase, comprised such that it is characterized by performing reaction by cholesterol dehydrogenase in the presence of a hydrazine hydrate, its salt, or its derivative(s).

**[0010]**

There exist NAD-CDH and NADP-CPH as cholesterol dehydrogenase used by this invention. The reaction system by cholesterol dehydrogenase is as shown in said reaction Formula A.

**[0011]**

A cholesterol dehydrogenase exhibits reversible reaction, equilibrium will be reached, when reaction advances to a generation of the cholestenone and progresses to some extent. Therefore, conventionally, it is made pH 9.0 vicinity which is the optimum pH of cholesterol dehydrogenase, and advance of reaction is accelerated further. While said enzyme amount is made to the minimal dose in such an optimum pH, when it is set as a reagent, a raise of the blank value in which the another enzyme mixed in a raw material originates can also be suppressed.

**[0012]**

This invention is based on the new

たはその誘導体の存在下にコレステロール脱水素酵素を反応させることにより、上記反応で生成された $\Delta 4$ -コレステノンのケトン基をブロックすることができるという新知見に基づくものである。この結果コレステロールの測定での逆反応を押さえることができ、広いpH範囲でコレステロールの定量を可能とするものである。具体的には、本発明では反応液のpHは、pH10.0を越えるアルカリ領域からpH7.0以下の中性領域まで適応できる。

#### 【0013】

本発明に用いる抱水ヒドラジン、その塩およびその誘導体としては、 $\Delta 4$ -コレステノンのケトン基をブロックすることができるものであれば、特に限定はない。抱水ヒドラジン誘導体としては、ヒドラジルを基本骨格基とする化合物が該当できる。これらの具体例としては、ヒドラジン(1水和物)、二塩化ヒドラジニウム、一臭化ヒドラジニウム、硫酸ヒドラジニウムが好適であり、そのほか塩化フェニルヒドラジニウム、フェニルヒドラジン-P-スルホン酸、硫酸フェニルヒドラジニウム、ヒドラジンピリジン等を挙げることができる。

#### 【0014】

本発明のコレステロールの定量法によれば、コレステロール脱水素酵素による反応を抱水ヒドラジン、その塩

knowledge that the ketone group of  $\Delta 4$ -cholestenone generated by said reaction can be blocked, by making cholesterol dehydrogenase react in the presence of a hydrazine hydrate, its salt, or its derivative(s). As a result, the reverse reaction in a measurement of cholesterol can be suppressed, and it can be made to perform assay of cholesterol in the wide pH range. Specifically, in this invention, pH of a reaction liquid can be adapted from the alkali region which exceeds pH 10.0 to the neutral region less than pH 7.0.

#### 【0013】

As the hydrazine hydrate and its salt which are used for this invention, and its derivative(s), if the ketone group of  $\Delta 4$ -cholestenone can be blocked, there will be no limitation in particular. As a hydrazine-hydrate derivative, the compound which makes a hydrazyl a basic structure group can be corresponded. As these examples, hydrazine (monohydrate), dichloride hydrazinium, hydrazinium monobromide, and hydrazinium sulfate are suitable. In addition, phenyl-chloride hydrazinium, phenylhydrazine-P-sulfonic acid, sulfuric-acid phenyl hydrazinium, hydrazine pyridine, etc. can also be mentioned.

#### 【0014】

According to the assay method of cholesterol of this invention, reaction by cholesterol dehydrogenase is performed in the presence

またはその誘導体の存在下に行うことになる。ここで添加する抱水ヒドラジン、その塩、その誘導体の量は、その種類、その組成、その他の条件によって異なるが、通常は反応系における組成物全量に対して5～500 mM、好ましくは20～200mMである。

**【0015】**

本発明の方法によるコレステロールの定量法は臨床検査の分野では、遊離型または結合型コレステロールのいずれの測定にも利用できる。即ち、遊離型コレステロールの測定では単独で、結合型コレステロールの測定では公知のコレステロールエステラーゼの反応系を組み合わせることにより測定が行われる。

**【0016】**

本発明の方法は動力学的方法および終点測定法の両者に応用できるが、特に終点測定法として臨床検査の分野で有用に用いることができる。通常、終点測定法では、反応が短時間に終結することが必要である。即ち、反応が長時間に渡って続くような場合は、検体によって反応時間が異なり自動分析装置のように短時間の測定による方法では再現性も悪く、臨床検査では適用できない。ところが、本発明によれば反応は2分～3分で終了するため臨床検査に極めて好適である。

of a hydrazine hydrate, its salt, or its derivative(s). The amount of the hydrazine hydrate and its salt which are added here, and its derivative(s) changes with the kind, its composition, and other conditions. Usually, it is 5 to 500 mM with respect to the composition whole quantity in a reaction system, preferably it is 20 to 200 mM.

**【0015】**

The assay method of cholesterol by the method of this invention is applicable also to any measurement of a free type or bonding type cholesterol in the field of a clinical laboratory test. That is, in a measurement of free type cholesterol, a measurement is independently performed by measurement of bonding type cholesterol by combining the reaction system of a well-known cholesterol esterase.

**【0016】**

The method of this invention can be applied by both dynamical method and end-point measurement method. However, it can use useful in the field of a clinical laboratory test in particular as an end-point measurement method. Usually, by an end-point measurement method, it is required for reaction to end in a short time. That is, when reaction continues over a long time, reaction time changes with test substances and reproducibility is also bad in the method of a short-time measurement like an autoanalyzer, it cannot apply in a clinical laboratory test. However, according to this invention, reaction

is very suitable for a clinical laboratory test, in order to complete in 2 to 3 minutes.

**【0017】**

本発明において、コレステロールの定量法は、緩衝液、NAD(P)およびNAD(P)-CDHを検体(血清、コレステロール等)と混合して、一定時間反応させ、生成するNAD(P)Hの増加を測定することによって行われる。本発明のコレステロールの定量法における基本原理はNAD(P)Hの生成反応である。ここでは主波長が340nmでのNAD(P)Hの吸光度の上昇を測定するため、吸光度の減少反応と比較すると検量線の上限が高くとれるため、コレステロールの測定範囲を広くとることができる。更にコレステロールオキシダーゼ法のような還元性物質の影響を受けることもない。

**[0017]**

In this invention, the assay method of cholesterol mixes buffer, NAD(P), and NAD(P)-CDH with test substances (blood serum, cholesterol, etc.), and fixed-time reaction is carried out. It is carried out by measuring the increase in NAD(P)H to generate. The basic principle in the assay method of cholesterol of this invention is generation reaction of NAD(P)H. Here, since a dominant wavelength measures a raise of the light absorbency of 340 nm NAD(P)H and the upper limit of an analytical curve can take highly compared with reduction reaction of a light absorbency, the wide measuring range of cholesterol can be taken. Furthermore, influence of a reducing substance like the cholesterol oxidase method is not received.

**【0018】****【実施例】**

以下、本発明を実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。実施例において使用した試薬は、以下に示したpH10.0、pH8.0、pH7.3のものである。また、これら試薬においては、抱水ヒドラジン等を添加したものと添加していないものを同時に作った。また、それぞれの反応性を考慮して酵素、補酵素およびヒドラジンの量を定めた。

**[0018]****[EXAMPLES]**

Hereafter, an Example is given and this invention is demonstrated. This invention is not limited to these. The reagent used in the Example is pH 10.0, pH 8.0, and pH 7.3 which were shown below. Moreover, in these reagents, what added the hydrazine hydrate etc., and the thing which is not added were made simultaneously. Moreover, the amount of an enzyme, a coenzyme, and a hydrazine was defined in consideration of each reactivity.

## 【0019】

## 【0019】

試薬A-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	6.5mM
	トリトンX-100	3g/l
	ヒドラジン	50mM
	トリス緩衝液 (pH10.0)	0.1M
試薬A-2	コレステロール脱水素酵素	10単位/ml
	トリトンX-100	3g/l
	トリス緩衝液 (pH10.0)	0.1M
Reagent A-1	Cholesterol esterase	6 unit/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	6.5 mM
	Triton X-100	3 g/l
	Hydrazine	50 mM
	Tris buffers (pH 10.0)	0.1M
Reagent A-2	Cholesterol dehydrogenase	10 unit/ml
	Triton X-100	3 g/l
	Tris buffers (pH 10.0)	0.1M

## 【0020】

## 【0020】

試薬a-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	8.4mM
	トリトンX-100	3g/l
	トリス緩衝液 (pH10.0)	0.1M
	トリス緩衝液 (pH10.0)	0.1M
試薬a-2	コレステロール脱水素酵素	25単位/ml
	トリトンX-100	3g/l
	トリス緩衝液 (pH10.0)	0.1M
Reagent a-1	Cholesterol esterase	6 unit/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	8.4 mM
	Triton X-100	3 g/l
	Tris buffers (pH 10.0)	0.1M
	トリス緩衝液 (pH10.0)	0.1M
Reagent a-2	Cholesterol dehydrogenase	25 unit/ml
	Triton X-100	3 g/l
	Tris buffers (pH 10.0)	0.1M



## 【0021】

## 【0021】

試薬B-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	6.5mM
	トリトンX-100	3g/l
	ヒドラジン	150mM
	トリス緩衝液 (pH8.0)	0.1M
試薬B-2	コレステロール脱水素酵素	15単位/ml
	トリトンX-100	3g/l
	トリス緩衝液 (pH8.0)	0.1M
Reagent B-1	Cholesterol esterase	6 unit/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	6.5 mM
	Triton X-100	3 g/l
	Hydrazine	150 mM
	Tris buffers (pH 8.0)	0.1M
Reagent B-2	Cholesterol dehydrogenase	15 unit/ml
	Triton X-100	3 g/l
	Tris buffers (pH 8.0)	0.1M

## 【0022】

## 【0022】

試薬b-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	8.4mM
	トリトンX-100	3g/l
	トリス緩衝液 (pH8.0)	0.1M
試薬b-2	コレステロール脱水素酵素	30単位/ml
	トリトンX-100	3g/l
	トリス緩衝液 (pH8.0)	0.1M
Reagent b-1	Cholesterol esterase	6 unit/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	8.4 mM
	Triton X-100	3 g/l
	Tris buffers (pH 8.0)	0.1M
Reagent b-2	Cholesterol dehydrogenase	30 unit/ml
	Triton X-100	3 g/l
	Tris buffers (pH 8.0)	0.1M

## 【0023】

## 【0023】

試薬C-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	6.5mM
	トリトンX-100	3g/l
	ヒドラジン	200mM
	リン酸緩衝液 (pH7.3)	0.1M
試薬C-2	コレステロール脱水素酵素	20単位/ml
	トリトンX-100	3g/l
	リン酸緩衝液 (pH7.3)	0.1M
Reagent C-1	Cholesterol esterase	6 unit/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	6.5 mM
	Triton X-100	3 g/l
	Hydrazine	200 mM
	Phosphate buffer (pH 7.3)	0.1M
Reagent C-2	Cholesterol dehydrogenase	20 unit/ml
	Triton X-100	3 g/l
	Phosphate buffer (pH 7.3)	0.1M

## 【0024】

## 【0024】

試薬c-1	コレステロールエステラーゼ	6単位/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	8.4mM
	トリトンX-100	3g/l
	リン酸緩衝液 (pH7.3)	0.1M
試薬c-2	コレステロール脱水素酵素	30単位/ml
	トリトンX-100	3g/l
	リン酸緩衝液 (pH7.3)	0.1M
Reagent c-1	Cholesterol esterase	6 unit/ml
	$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	8.4 mM
	Triton X-100	3 g/l
	Phosphate buffer (pH 7.3)	0.1M
Reagent c-2	Cholesterol dehydrogenase	30 unit/ml
	Triton X-100	3 g/l
	Phosphoric acid buffer solution (pH 7.3)	0.1M

## 【0025】

## 実施例1

本発明の方法の反応性を調べた。試薬a-1、a-2および試薬B-1、B-2を用いて、あらかじめ分子吸光係数の管理された日立7150自動分析機を使い、タイムコースを確認した。その結果は図1に示した通りである。しかして、試薬a-1、a-2および試薬B-1、B-2とも反応は2～3分で終了しているが、試薬a-1、a-2は完全にコレステロールを消費しないうちに反応が停止し、試薬B-1、B-2ではコレステロール脱水素酵素の反応が平衡に達することなくコレステロールを消費していることがわかる。

## [0025]

## Example 1

The reactivity of the method of this invention was investigated. Hitachi 7150 autoanalyzer by which the molecular extinction coefficient was managed beforehand was used, using reagent a-1, a-2 and reagent B-1, B-2, and the time course was confirmed. The result is as having shown in FIG. 1. Thus, reaction has completed reagent a-1, a-2 and reagent B-1, B-2 in 2 to 3 minutes. However, before reagent a-1, a-2 consume cholesterol completely, reaction stops them, in reagent B-1, B-2, it turns out that cholesterol is consumed, without reaction of cholesterol dehydrogenase reaching equilibrium.

## 【0026】

## 実施例2

これらの試薬を用いて、日立7150形自動分析装置により以下の操作を行った。まず、検体として血清の希釈系列それぞれ10  $\mu$ lに第1試薬250  $\mu$ lを加えて37°Cで5分間加温し、主波長340nm、副波長700nmで吸光度を測定した。次に、第2試薬100  $\mu$ lを加えて37°Cで5分間加温し、同じ波長で吸光度変化量を測定した。同様に検体の代わりに精製水を用いて試薬ブランクを測定した。更に4種類の検体について既知の標準液の測定値をもとにして求める方法と、直接NADHの分子吸光係数( $\epsilon = 6.3 \text{ cm}^2/\text{m mole}$ )から求める方法で測

## [0026]

## Example 2

Hitachi 7150 type autoanalyzer performed the following operation using these reagents. First, 250 microliter of 1st reagents is added to 10 microliter of each dilution series of a blood serum as a test substance, and it heats for 5 minutes at 37 degrees C, the light absorbency was measured with the dominant wavelength of 340 nm, and sub-wavelength 700 nm. Next, 100 microliter of 2nd reagents is added and it heats for 5 minutes at 37 degrees C, the light-absorbency variation was measured at the same wavelength. The purified water was similarly used instead of the test substance, and the reagent blank was

定した。そして対照として市販のコレステロール測定用試薬(国際試薬(株)製品でコレステロールオキシダーゼを用いる方法)による測定値も求めた。これらの結果は図2～図4および表1に示す。

measured. Furthermore, it measured by the method of obtaining based on the measured value of a known standard solution about the test substance of a 4 type, and the method of obtaining from direct NADH molecular extinction coefficient ( $\epsilon=6.3\text{cm}^2/\text{m mole}$ ). And the measured value with the as a control commercially available reagent for a cholesterol measurement (method to use a cholesterol oxidase by International Reagents K.K. product) was also obtained. These results are shown to FIGS. 2-4 and Table 1.

【0027】

【0027】

【表1】

【TABLE 1】

検体のコレステロール測定結果 (単位は $\text{mg}/\text{dl}$ )

(1)標準液を用いる方法

試薬 検体No	A-1 A-2	a-1 a-2	B-1 B-2	b-1 b-2	C-1 C-2	c-1 c-2	市販品 (対照)
1	181	185	183	204	186	—	182
2	141	147	143	157	144	—	147
3	234	248	236	242	233	—	234
4	182	184	185	196	181	—	182

(2)NADHの分子吸光係数による方法

試薬 検体No	A-1 A-2	a-1 a-2	B-1 B-2	b-1 b-2	C-1 C-2	c-1 c-2
1	175	162	179	121	180	—
2	137	129	140	101	147	—
3	232	227	233	150	240	—
4	180	159	181	123	181	—

Cholesterol measurement result of a test substance (unit is mg/dl)							
(1) Method using standard solution							
Reagent							Commercial item (control)
Test substance No							

(2) Method of molecular extinction coefficient of NADH						
Reagent						
Test substance No						

## 【0028】

以上の結果、本発明の方法はヒドラジンを添加しない従来の方法に比べ検体の希釈系列からみて直線性が優れていることが判る。また検体の測定値からみると、本発明の方法は標準液の測定値から求めた値と、NADHの分子吸光係数から求めた値は一致し、しかも市販の試薬ともよく一致した値が得られた。これに対して、ヒドラジンを添加しない従来の方法はNADHの分子吸光係数から求めた値が全般に低値を示し、終点測定法での測定に問題があることが判る。更に本発明の方法では、各pH間で直線性や測定値に有意な差がないことも判る。

## 【0028】

The above shows that the method of this invention is excellent in a linearity compared with the conventional method which does not add a hydrazine, in view of the dilution series of a test substance. Moreover, in view of the measured value of a test substance, the value which obtained the method of this invention from the measured value of a standard solution, and the value obtained from the molecular extinction coefficient of NADH are in agreement, and the value which was well in agreement also with the commercially available reagent was acquired. On the other hand, the value which the conventional method which does not add a hydrazine obtained from the molecular extinction coefficient of NADH shows a low value generally, it turns out that a problem exists in a measurement by an end-point measurement method. Furthermore, by the method of this invention, it also turns out that there is no significant difference in a linearity or a measured value between each pH.

【0029】

## 【発明の効果】

以上説明したように、本発明の方法は広範囲のpH領域において適応可能で、従って酵素の可逆的反応の起こりにくいコレステロール定量法であり、終点測定法としてもコレステロールの定量が可能であり、自動分析機が普及している臨床検査の分野で、有用な方法として供することができる。また広範囲のpH域が設定できるため他の共役酵素反応系と組み合わせることも容易で実用上の応用性も高いという効果を有する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

本発明の方法の反応性を示したグラフである。

## 【図2】

本発明の方法と従来の方法(pH10.0のとき)の対比を示したグラフである。

## 【図3】

本発明の方法と従来の方法(pH8.0のとき)の対比を示したグラフである。

[0029]

## [ADVANTAGE OF THE INVENTION]

As explained above, the method of this invention is a cholesterol assay method from which it can be adapted in wide range pH region, therefore reversible reaction of an enzyme does not occur easily. Assay of cholesterol can be performed also as an end-point measurement method, and it can offer as a useful method in the field of the clinical laboratory test through which the autoanalyzer has prevailed. Moreover, since wide range pH region can be set, it has the effect that also combining with an another conjugation enzyme reaction system and easy and practical applicability are high.

## [BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS]

## [FIG. 1]

It is the graph which showed the reactivity of the method of this invention.

## [FIG. 2]

It is the graph which showed contrast of the method of this invention, and a conventional method (at the time of pH 10.0).

## [FIG. 3]

It is the graph which showed contrast of the method of this invention, and a conventional method (at the time of pH 8.0).

【図4】

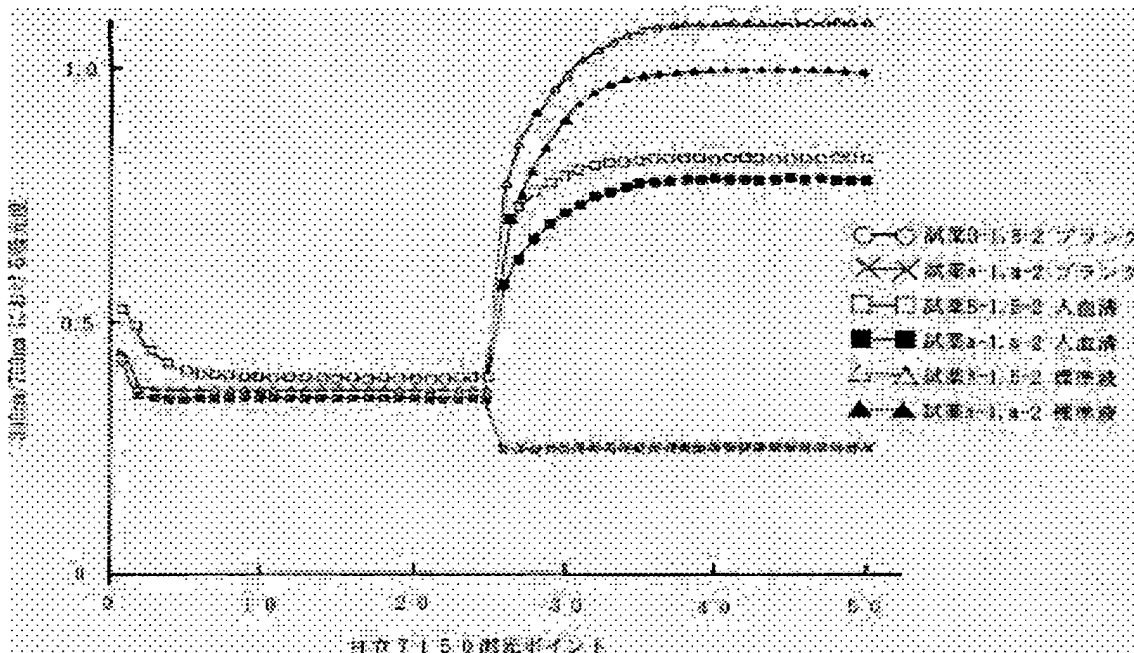
本発明の方法と従来の方法(pH7.3のとき)の対比を示したグラフである。

【FIG 4】

It is the graph which showed contrast of the method of this invention, and a conventional method (at the time of pH 7.3).

【図1】

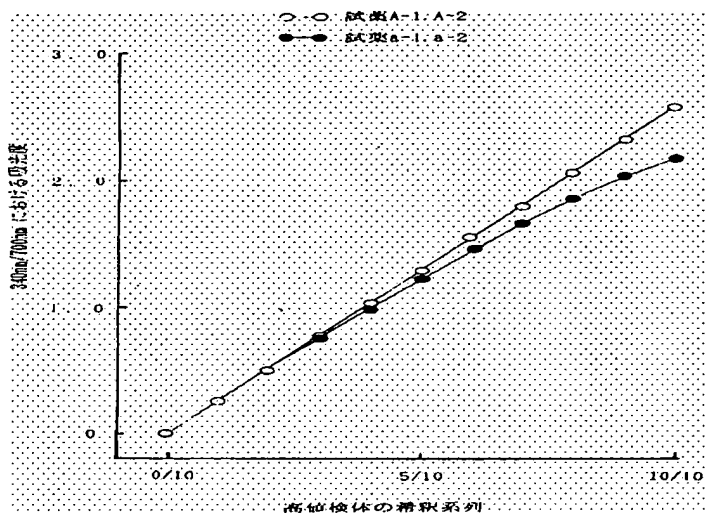
【FIG 1】



Light absorbency in 340nm / 700nm	Reagent B-1, B-2	Blank
Hitachi 7150 photometry point	Reagent a-1, a-2	Blank
	Reagent B-1, B-2	Human blood serum
	Reagent a-1, a-2	Human blood serum
	Reagent B-1, B-2	Standard solution
	Reagent a-1, a-2	Standard solution

【図2】

[FIG. 2]



Reagent A-1, A-2

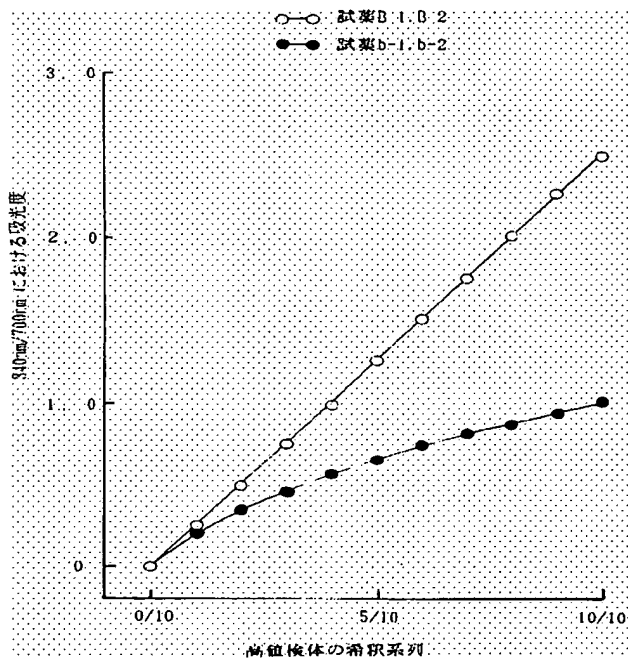
Reagent a-1, a-2

Light absorbency in 340nm / 700nm

Dilution series of high-value test substance

【図3】

[FIG. 3]

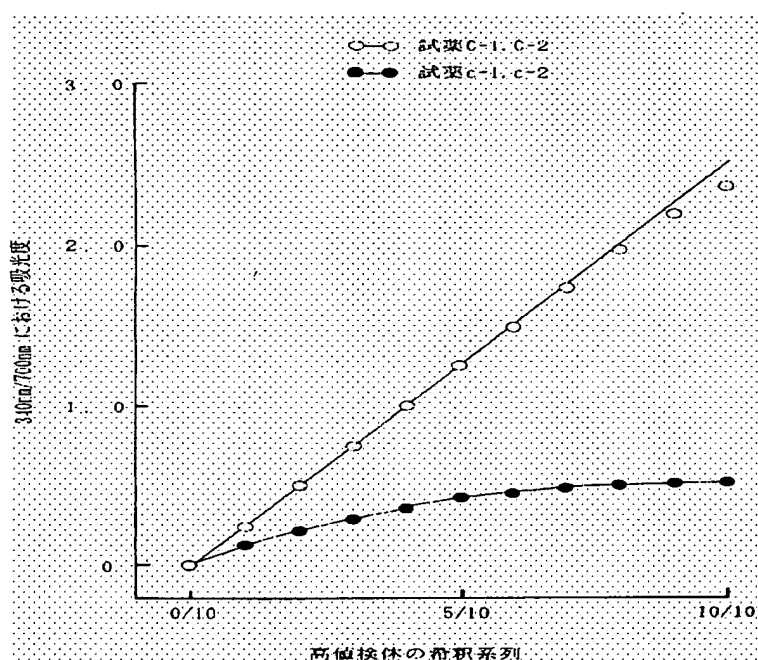




Reagent B-1, B-2
Reagent b-1, b-2
Light absorbency in 340nm / 700nm
Dilution series of high-value test substance

【図4】

[FIG. 4]



Reagent C-1, C-2
Reagent c-1, c-2
Light absorbency in 340nm / 700nm
Dilution series of high-value test substance

## ———【手続補正書】

## ----[AMENDMENTS]

## 【提出日】

平成4年2月26日

## [FILING DATE]

February 26, Heisei 4

## 【手続補正1】

## [AMENDMENT 1]

## 【補正対象書類名】 明細書

## [AMENDED SECTION] SPECIFICATION

## 【補正対象項目名】 0003

## [AMENDED ARTICLE] 0003

## 【補正方法】 変更

## [METHOD OF AMENDMENT] REWRITE

## 【補正内容】

## [CONTENTS OF AMENDMENT]

## 【0003】

臨床検査の分野では、いわゆる終点測定方法(エンドポイント法ともいう)または、初速度測定法(レイトアッセイ法ともいう)と称する動力的測定法のいずれかが用いられている。コレステロールオキシダーゼを用いる方法には、このような動力的測定法も知られている(特公昭58-18080号公報)が、この方法でも前述のような還元性物質の影響を受けるという問題点は依然として未解決のままであった。

## [0003]

In the field of a clinical laboratory test, it is what is called the end-point measurement method (it is also mentioned the endpoint method), or the dynamical measuring method called an initial rate measuring method (it is also mentioned a rate assay), either one are used.

Although such a dynamical measuring method was also known by the method of using a cholesterol oxidase (Japanese Patent Publication No. 58-18080), the problem of receiving the influence of the above reducing substances also by this method was still unsolved.

## 【手続補正2】

## [AMENDMENT 2]

【補正対象書類名】 明細書

[AMENDED SECTION] SPECIFICATION

【補正対象項目名】 0010

[AMENDED ARTICLE] 0010

【補正方法】 変更

[METHOD OF AMENDMENT] REWRITE

## 【補正内容】

## [CONTENTS OF AMENDMENT]

## 【0010】

本発明で使用されるコレステロール脱水素酵素としては、NAD-CDHとNADP-CDHがあり、コレステロール脱水素酵素による反応系は前記反応式Aで示した通りである。

## [0010]

There exist NAD-CDH and NADP-CDH as cholesterol dehydrogenase used by this invention. The reaction system by cholesterol dehydrogenase is as shown in said reaction Formula A.

## THOMSON SCIENTIFIC TERMS AND CONDITIONS

*Thomson Scientific Ltd shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Thomson Scientific translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Thomson Scientific Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our website:

["www.THOMSONDERWENT.COM"](http://www.THOMSONDERWENT.COM) (English)

["www.thomsonscientific.jp"](http://www.thomsonscientific.jp) (Japanese)